

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：21401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11956

研究課題名(和文)セシウム(Cs)低吸収変異体の解析による水稻Cs吸収メカニズムの解明

研究課題名(英文)Analysis of Cs uptake mechanism in *Oryza sativa* by using chemical mutants.

研究代表者

頼 泰樹 (RAI, HIROKI)

秋田県立大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：30503099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：2011年に福島で発生した原発事故は広範囲の¹³⁷Csの土壤汚染を引き起こし、農産物の安全の確保が重大な問題となっている。我々はCs低吸収のイネ変異体を単離し、根の表面のK輸送体OsHAK1が、低K条件下でのイネへのCs+流入の主要経路であることを明らかになった。低から通常の土壌のK濃度に相当する水耕栽培で、oshak1のCs+吸収量は野生型の1/8以下となり、圃場試験では玄米及び茎葉のCsが激減したが、Kの取り込みと玄米収量は野生型とほぼ同様となった。放射性Cs汚染地域でのCs低吸収水稻の栽培は農耕地のCs汚染に対し食の安全性を高めるための有効な対策となりうると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Nuclear incident at the Fukushima in 2011 have resulted in widespread soil contamination by caesium-137 which raised serious food security issues. We isolated rice mutants with low caesium uptake and reveal that the *Oryza sativa* potassium transporter OsHAK1, which is expressed on the surfaces of roots, is the main route of caesium influx into rice plants, especially in low-potassium conditions. During hydroponic cultivation with low-to-normal potassium concentrations, caesium influx in oshak1 was no greater than one-eighth that in wild type. In field experiments, oshak1 showed dramatically reduced caesium concentrations in grains and shoots, but their potassium uptake was not greatly affected and their grain yields were similar to that of wild type. These results show that low-caesium-uptake rice lines can be developed for cultivation in radiocaesium-contaminated areas.

研究分野：植物栄養学

キーワード：セシウム イネ 低吸収 カリウム輸送体 OsHAK1 放射性核種 ¹³⁷Cs

1. 研究開始当初の背景

2011年に発生した東日本大震災は、原子力発電所事故を引き起こし、放出された放射性元素が広範囲の土壌や植物を汚染した。環境中に放出された放射性核種で半減期が短い¹³¹Iなどはすでに検出されない。しかし、¹³⁷Csは原発からの放出量が多く、半減期も30.2年と長いため、長期間にわたり高い空中線量や農作物の汚染が原因となる。被災地の風評被害を防ぎ、農産物の安全性を高めるためには、主要な作物でCsの吸収量を低減させる技術を開発することが求められている。

震災直後から多くの研究者による懸命な調査やモニタリングにより、環境中における¹³⁷Csの挙動の把握が進められてきた。Csの土壌への吸着は他の1価カチオンよりもはるかに強く、いったん吸着したCsは粘土鉱物から容易には脱着しないため、結果的に土壌の表層に集積する。また、Csは粘土鉱物のFrayed Edgeと呼ばれるサイトにイオンの脱水を伴う形で吸着すると、ほぼ不可逆的に固定され時間の経過とともに植物に吸収されにくくなることが明らかにされている(文献)。さらにカリウム(K)を多量に施肥することで作物に取り込まれるCsを競合効果で抑制できることもわかってきている(文献)。現在、これらの知見をもとに高線量の地域では表土の剥ぎ取りによる除染が進められ、農作物の作付けではKの多肥によりCsの吸収量を抑える取り組みが進められている。しかし、表土の剥ぎ取りは膨大な量の土壌の処理(貯蔵)が必要となり、Kの多肥もコストやK肥料自体に放射性の⁴⁰Kを含むこと、またいつまで続けるべきかなど多くの問題点を含んでいる。

これに対し、低吸収性品種など作物の改良は種子の提供だけで済むため、極めて低コストでかつ環境にやさしい対策といえる。水稻については様々な品種のCsの吸収性試験が行われたが主要食用品種のコシヒカリ、あきたこまちなどはいずれもCs吸収量が少ないグループに属している。

突然変異源処理などでCsの低(高)吸収品種を開発し、また作出した系統を解析してCsなどの核種が植物に取り込まれるメカニ

ズムを明らかにすることができれば、より効果的で実用的なCs低減技術の提供に結びつくと考えられた。

2. 研究の目的

我々は水稻の重金属低吸収系統の獲得を目的に、アジ化ナトリウムおよびMNUを用いたあきたこまちの突然変異系統を作出した。自殖後代のM₃世代を2010年からCdやZnなどの重金属汚染圃場で栽培し、玄米の重金属を分析してきた。東日本大震災による原発事故以降、Cs吸収についても変異系統が得られる可能性を考え、分析項目にCsを追加しスクリーニングを行った。

8027個体の突然変異体を分析した結果、玄米中Cs濃度が極めて低濃度であり、かつ生育やK吸収量がコントロールのあきたこまちとほぼ同等の3系統を単離した。先述の通り、Csは時間の経過とともに土壌に強く固定化され、植物のCs吸収は極めて強く土壌の影響を受けたため、Cs(無添加、0.5ppm、1ppm)を添加した土壌(大潟村水田土壌:強グライ土)を用いてこの3系統を栽培した。**3系統の玄米Cs含量はコントロールの10%以下であり、Cs吸収がほぼ抑えられていた。**木村氏B液で2週間栽培したこれらの系統の幼植物に対し¹³³Cs(10ppb条件)を添加し、Csの吸収実験を行い、経時的にサンプリングを行い各系統のCs吸収特性を解析した。その結果、コントロールに対し3系統の根への吸収量は約1/5と極めて低く抑えられていた。本研究はこの3つの変異系統を材料とし、遺伝子解析により水稻がCsを吸収する輸送体の原因遺伝子を特定し、また発現解析を行うことで水稻がCsを吸収するメカニズムを明らかにする。そして、作物の品種改良、吸収を抑制する栽培法の確立などにより効率的なCs低減技術の開発を目指す。

3. 研究の方法

Cs低吸収突然変異3系統についての遺伝学的解析を行い、原因遺伝子を特定する。

突然変異系統同士の交配でCs低吸収性が同一遺伝子によるものかを明らかにし、遺伝子単離に用いる系統の絞り込みを行った。

カサラスとの交配系統をマッピング集団として用いて原因遺伝子のマッピングを実施した。

あきたこまちとのバッククロス系統の次世代シーケンサによるゲノム解析を行うことで原因遺伝子の特定を行った。

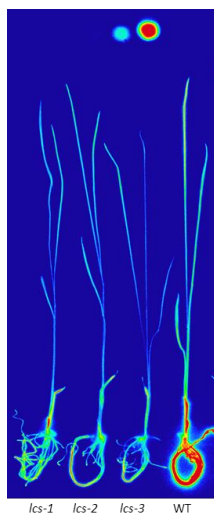
特定した原因遺伝子を変異系統に再導入し、形質転換体を作成し、形質転換体の Cs 吸収能が相補されることの確認を行った。

水耕栽培及び現地圃場試験を通し水稻の Cs 吸収メカニズムを解明した。

4. 研究成果

1) セシウム低吸収系統の原因遺伝子解析

3 系統の遺伝子解析について、これら 3 系統は変異の処理や外観形質などから独立に生じた系統であると考えられた。しかし、各系統を交配した F₁ を用いた対立性試験の結果、3 系統の Cs 吸収が F₁ 世代では復帰しなかったため、セシウム低吸収に係る遺伝子は同一の遺伝子に起因するものであると考えられた。セシウムを少量添加 (10ppb / L) した木村氏 B 液を用いた水耕栽培において、セシウム低吸収系統の幼植物の根への Cs 吸収が抑制されることが明らかとなった。



¹³⁷Cs を用いたトレーサー実験
lcs1~3; セシウム低吸収系統
WT; あきたこまち
セシウム低吸収系統は根への Cs の吸収が大幅に低い。

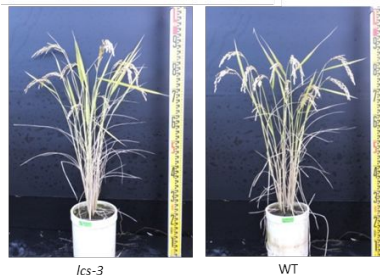
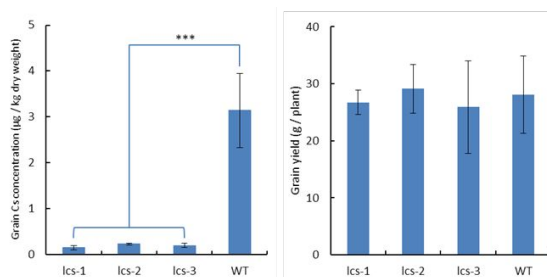
この実験系によりカサラスとの交配系統 F₂ 世代の Cs 吸収性により低吸収個体を選抜し、遺伝子マッピングを行った。その結果、Cs が低吸収となる原因遺伝子は第 4 染色体に座上し、その領域の絞り込みを行った。次世代シーケンサによる 3 系統のゲノム解析と合わせて候補遺伝子の絞り込みを行った結果、

原因遺伝子はカリウムの高親和性トランスポーターをコードする *OsHAK1* であることが示された。

原因遺伝子が *OsHAK1* であることを確認するため、候補遺伝子の組み換えによる相補性試験を実施した。Native のプロモーターと強制発現系のユビキチンプロモーターの 2 種類のプロモーターに日本晴の *OsHAK1* を連結させたコンストラクトをそれぞれ構築した。これらのコンストラクトを突然変異系統 (lcs-3) のカルスにアグロバクテリウムをもちいて導入し、形質転換体を作成した。形質転換体は T₁ 世代および T₂ 世代ともに *OsHAK1* の導入に伴いセシウムの吸収性が野生型と同等レベルに復帰した。これにより、セシウム低吸収突然変異体の原因遺伝子は *OsHAK1* であることが同定された。

2) セシウム低吸収系統の生理学的解析

OsHAK1 は根圏の K⁺濃度が低いときに、高発現し K⁺取り込みを担う主要な K⁺トランスポーターの一つである。*OsHAK1* のノックアウトにより、根圏の K 濃度が低い場合には Cs⁺の取り込みは大幅に抑制されるが、K⁺の吸収および玄米収量は試験した 2 カ所 (秋田県大潟村および藤里町) の圃場では大きな影響を受けなかった。また、玄米のカリウム濃度も野生型とほぼ同等であった。それに対し、玄米のセシウム濃度は大潟村では 5%以下、藤里町でも 25%以下と低く抑えられていた。

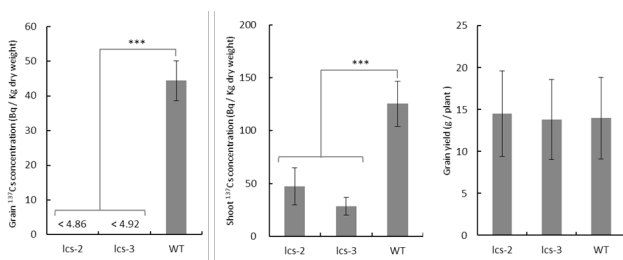


圃場およびワグネルポットでの栽培試験結果
lcs1~3; セシウム低吸収系統
WT; あきたこまち
セシウム低吸収系統は玄米 Cs が大幅に低くなるが、収量はほぼ同等である。外観形質にも大きな違いはない。

セシウムは粘土粒子のフレイドエッジに強く吸着されることが知られており、土壌に

新たに供給されたセシウムのほうが植物に吸収されやすいことが明らかになっている。そこで2種類の土壌(大潟村;強グライ土、藤里町;黒ボク土壌)にCsを無添加、0.5ppm、1.0ppmとなるように添加し、3系統の突然変異体をワグネルポットで栽培した。粘土含量の多い大潟村の土壌で栽培するとこれら系統の玄米Cs含量は、Cs添加の有無によらずコントロールの10%以下でありCs吸収がほぼ抑えられていた。また、粘土含量が少なく、比較的水溶性Csが多い状態が維持される藤里町の土壌では玄米Cs含量は25%前後に吸収が抑制されていた。

2016年に実施した福島県の現地試験圃場(低K⁺圃場)での栽培では対照区と比較し、玄米の放射性Cs濃度は1/10以下となり、低K⁺条件下において*oshak1*変異体のCs吸収抑制効果は高いことが示された。この圃場は極端なカリウム欠乏圃場(土壌中のCsが吸われやすい状態)であったが、親品種の玄米の¹³⁷Csが45Bq/kgであったのに対し、Cs低吸収系統の玄米の¹³⁷Csは検出限界以下となった(検出限界4.5Bq/kg)。開花、登熟期に若干の遅れ、稈長も短いことなども観察されてが、籾の登熟に問題はなく、対照区と玄米収量に差はなかった(低収量レベルであった)。また、同圃場での試験を2017年にも実施した結果、鳥害のため収量は調査できなかったが、Csの吸収性は同様であることが示された。



lcs2,3: セシウム低吸収系統 WT: あきたこまち
カリウム欠乏状況の現地圃場において放射性セシウムの吸収量は玄米Csが野生型の1/10以下となった。

次に水耕栽培において、*OsHAK1*の有無により水稻根におけるK/Csの選択性にどの程度の差がみられるかを調べた。通常の土壌条件(K⁺:0~100μM, Cs⁺:10ppb)においては、*OsHAK1*のノックアウトにより、Cs⁺吸収量は1/8以下になることが明らかとなった。また、

K⁺濃度が高くなると変異体と野生型のCs⁺吸収量の差は減少し、1000μM以上ではその差はほとんどなくなった。以上のように、Cs⁺の主要吸収経路は*OsHAK1*であること、特に低K⁺条件下においてCs⁺は多く取り込まれることが*OsHAK1*の機能からも明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

- 1) Cesium uptake by rice roots largely depends upon a single gene, *HAK1*, which encodes a potassium transporter. Rai H., Yokoyama S., Satoh-Nagasawa N., Furukawa J., Nomi T., Ito Y., Fujimura S., Takahashi H., Suzuki R., Mannai Y.E.L., Goto A., Fuji S., Nakamura S., Shinano T., Nagasawa N., Wabiko H. and Hattori H. *Plant and Cell Physiology* 査読有, vol.58(9), p1486-1493 (2017)
- 2) Genetic analysis of cadmium accumulation in shoots of sorghum landraces. Tsuboi K., Shehzad T., Yoneda J., Uruguchi S., Ito Y., Shinsei L., Morita S., Rai H., Nagasawa N., Asari K., Suzuki H., Itoh R., Saito T., Suzuki K., Takano I., Takahashi H., Sakurai K., Watanabe A., Akagi H., Tokunaga T., Itoh M., Hattori H., Fujiwara T., Okuno K., Tsutsumi N. and Satoh-Nagasawa N. *Crop Science* 査読有, vol. 57(1), p22-31 (2017)
- 3) The high correlation between DNA and chloroform-labile N in various types of soil. Yokoyama S., Yuri K., Nomi T., Komine M., Nakamura S., Hattori H. and Rai H. *Applied Soil Ecology* 査読有, vol. 117-118, p1-9 (2017)

[学会発表](計3件)

- 1). 頼 泰樹、横山 咲、佐藤奈美子、古川純、能美多希子、伊藤那香、森田祥司、藤村恵人、後藤明俊、信濃卓郎、永澤信洋、我彦廣悦、中村進一、服部浩之 セシウム低吸水稻のCs/K吸収特性と現地試験結果

日本土壤肥料学会 2017 年度仙台大会

2). 頼 泰樹、横山 咲、由利 かほる、佐藤 奈美子、永澤 信洋、高橋 秀和、藤 晋一、保田 謙太郎、中村 進一、服部 浩之 セシウム低吸収の水稻突然変異体の吸収制御遺伝子解析
日本土壤肥料学会 2016 年度佐賀大会

3). 頼 泰樹、横山 咲、由利 かおる、佐藤 奈美子、永澤 信洋、高橋 秀和、藤 晋一、中村 進一、服部 浩之 セシウムを吸わない突然変異水稻の開発とその解析
日本土壤肥料学会 2015 年度京都大会

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：セシウム吸収を制御する遺伝子及びセシウム低吸収植物

発明者：頼 泰樹，横山 咲，佐藤 奈美子，永澤 信洋，高橋 秀和，藤 晋一，中村 進一，服部 浩之

権利者：秋田県立大学

種類：特許

番号：2016-167064

出願年月日：2016-08-29

国内外の別：国内

取得状況(計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

頼 泰樹 (RAI, Hiroki)

秋田県立大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：30503099

(2)研究分担者

永澤(佐藤) 奈美子

(NAGASAWA, Namiko)

秋田県立大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：00535289

永澤 信洋 (NAGASAWA, Nobuhiro)

秋田県立大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：90599268

高橋 秀和 (TAKAHASHI, Hidekazu)

秋田県立大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：00325937

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

該当なし